

## 莽草酸脱氢酶（SD）活性检测试剂盒（微量法）

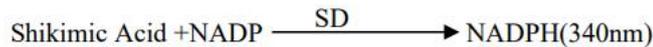
产品货号：BA1961

产品规格：100T/96S

### 产品简介：

莽草酸途径是存在于植物和微生物中的一条重要的代谢途径，莽草酸脱氢酶(EC 1.1.1.25) 是莽草酸合成代谢途径中催化第四步反应的关键酶。

莽草酸脱氢酶催化莽草酸和NADP产生NADPH，检测340nm下的吸光值增加速率来表示SD活性。



注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体10mL×1支	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃

### 溶液的配制：

1. 提取液：内含不溶物，用前摇匀。
2. 试剂二：临用前加入5mL蒸馏水溶解。
3. 试剂三：临用前加入10mL蒸馏水溶解。
4. 工作液的配制：根据用量按照试剂一：试剂二：试剂三为7:4:8的体积比例充分混匀，现用现配，用前25℃预热15min。

### 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液（加入前摇匀））进行冰浴匀浆，然后8000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
2. 细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细胞数量（10<sup>4</sup>个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后8000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
3. 液体：直接检测。

#### 二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。
2. 工作液25℃预热10min以上。
3. 操作表：在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入下列试剂：



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
工作液	190	190
样本	-	10
蒸馏水	10	-

加入样本即开始计时，充分混匀后于340nm处测定20s时的吸光值A1和5min20s时的吸光值A2，计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A2_{\text{空白}} - A1_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}$ （空白管只需做1-2次）。

### 三、SD酶活性计算

#### A、按微量石英比色皿计算：

##### 1. 按样本蛋白浓度计算

酶活定义：每毫克蛋白每分钟产生1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{SD酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

##### 2. 按样本质量计算

酶活定义：每克样本每分钟产生1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{SD酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W + V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

##### 3. 按细胞数量计算

酶活定义：每 $10^4$ 个细胞每分钟产生1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{SD酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T \\ &= 643 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

##### 4. 按液体体积计算

酶活定义：每mL液体样本每分钟产生1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{SD酶活 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 643 \times \Delta A$$

$\epsilon$ : NADPH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径,  $1 \text{ cm}$ ;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 反应体系中样本体积,  $0.01 \text{ mL}$ ;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $W$ : 样本质量,  $\text{g}$ ;  $T$ : 反应时间,  $5 \text{ min}$ ;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ ;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积,  $1 \text{ mL}$ 。

#### B、按96孔UV板计算：

将上述公式中的 $d=1 \text{ cm}$ 改为 $d=0.6 \text{ cm}$ （96孔板光径）进行计算即可。

#### 注意事项：

1. 样本提取上清液置于冰上待测，且样本提取完成后建议2h内测完。
2. 样本的蛋白浓度需自行测定，由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约 $1 \text{ mg/mL}$ ），所以测定样本蛋白浓度时需扣除提取液自身蛋白浓度。
3.  $\Delta A$ 大于1时，建议将样本稀释后再进行测定。当 $\Delta A$ 小于0.01时，可以延长反应时间（10min或15min）来测定。
4. 空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过0.01。

#### 实验实例：

1. 取 $0.1 \text{ g}$ 稗草，加入 $1 \text{ mL}$ 提取液，进行样本处理，取上清按照测得步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}} = 0.2771 - 0.2433 = 0.0338$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A2_{\text{空白}} - A1_{\text{空白}} = 0$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}} = 0.0338$ ，按照样本质量计算得：  
SD酶活 (U/g 质量) =  $643 \times \Delta A \div W = 217.334 \text{ U/g 质量}$ 。



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com